



Doc 218472US0X/vdm

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL, et al.

GAU: 1645

SERIAL NO: 10/075,460

EXAMINER:

FILED: February 15, 2002

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE rpsL GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	101 07 230.9	February 16, 2001
GERMANY	101 62 386.0	December 19, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ GERMANY #101 62 386.0 is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☒ GERMANY #101 07 230.9 was filed in above application Serial No. 10/075,460 filed February 15, 2002.
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

RECEIVED
APR 01 2002
TECH CENTER 1600/2900

10/075,460

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

101 62 386.0

Anmeldetag:

19. Dezember 2001

Anmelder/Inhaber:

Degussa AG,
Düsseldorf/DE

Bezeichnung:

Für das rpsL-Gen kodierende Nukleotid-
sequenzen

Priorität:

16.02.2001 DE 101 07 230.9

IPC:

C 12 N, C 12 P, C 07 H

RECEIVED
APR 01 2002
TECH CENTER 1600/2900

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. März 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Wallner

Für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das rpsL-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rpsL-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des
5 ribosomalen Proteins S12 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i), die die
Aktivität des Proteins/Polypeptides nicht
verändern

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind schließlich
Polynukleotide ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotide enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der
Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den
25 Positionen 1 und 499,
- b) Polynukleotide enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der
Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den
Positionen 500 und 883,

- c) Polynukleotide enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide ausgewählt aus der
Nukleotidsequenz von SEQ ID No. 1 zwischen den
Positionen 884 und 1775.

5 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,
enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1
dargestellt;

10 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die
Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt,
enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

15 coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in
denen das rpsL-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im
wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die
erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung
einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,
20 die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit
einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen
Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon
enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
25 enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA
und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise
Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die
für das ribosomale Protein S12 kodieren, oder um solche
Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu
30 isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
rpsL-Gens aufweisen. Sie können ebenso als Sonde auf
sogenannte "arrays", "micro arrays" oder "DNA chips"

aufgebracht werden, um die entsprechenden Polynukleotide oder hiervon abgeleitete Sequenzen wie z.B. RNA oder cDNA zu detektieren und zu bestimmen.

5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das ribosomale Protein S12 kodieren.

10 Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 15 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

20 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

25 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens besonders 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, 30 und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragmentes.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des ribosomalen Proteins S12 und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das rpsL-Gen kodierenden, bevorzugt endogenen, Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%,

25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der
- 10 Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 15 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 20 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 25 und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

- 30 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1

Corynebacterium glutamicum DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM5715 und
Corynebacterium glutamicum DSM12866.

Das neue, für das ribosomale Protein S12 kodierende rpsL-
5 Gen von C. glutamicum wurde isoliert.

Zur Isolierung des rpsL-Gens oder auch anderer Gene von
C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
10 Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
15 Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032,
20 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,
1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326)
25 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli
können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,
30 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene,
19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich
besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und
rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der
Stamm DH5 α mc^r, der von Grant et al. (Proceedings of the

National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren

- 5 subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

- 10 Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

- 15 Die neue für das Gen rpsL kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins
20 abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des rpsL-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, dass wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

- 25 Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der
30 Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins
35 führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen

werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, dass Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

5 Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten
10 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1
15 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben
20 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter
25 Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit
30 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die
35 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ

niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x
5 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C
eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit
Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%
Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride
sind weniger stabil und werden durch Waschen unter
10 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise
durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und
gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's
Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,
Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine
15 Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist
gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x
SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der
Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von
50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert
20 werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens
80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der
eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur
Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt
erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche
25 Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No.
1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe
der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann
unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide
30 Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK,
1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer
Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, dass coryneforme Bakterien nach
Verstärkung des rpsL-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren
35 produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße rpsL-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.
- Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode

der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei
10 Kopien des betreffenden Gens.

Es wurde weiterhin gefunden, dass Aminosäureaustausche in dem Abschnitt zwischen Position 38 bis 48 der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins S12 dargestellt in SEQ ID No. 2 die Lysinproduktion coryneformer Bakterien
15 verbessern.

Vorzugsweise wird L-Lysin an der Position 43 gegen jede andere proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Lysin ausgetauscht, wobei der Austausch gegen L-Histidin oder L-Arginin bevorzugt wird. Ganz besonders bevorzugt wird der
20 Austausch gegen L-Arginin.

In SEQ ID No. 3 ist die Basensequenz des in Stamm DM1545 enthaltenen Allels rpsL-1545 dargestellt. Das rpsL-1545 Allel kodiert für ein Protein, dessen Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 4 dargestellt ist. Das Protein enthält an
25 Position 43 L-Arginin. Die DNA Sequenz des rpsL-1545 Allels (SEQ ID No. 3) enthält an Position 128 des Kodierbereichs (CDS), das entspricht Position 627 der in SEQ ID No. 3 dargestellten Sequenz, die Base Guanin. Die DNA-Sequenz des Wildtypgens (SEQ ID No. 1) enthält an dieser Position die
30 Base Adenin.

Für die Mutagenese können klassische Mutageneseverfahren unter Verwendung mutagener Stoffe wie beispielsweise N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder ultraviolettes Licht verwendet werden. Weiterhin können für die Mutagenese in-

vitro Methoden wie beispielsweise eine Behandlung mit Hydroxylamin (Miller, J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992) oder mutagene Oligonukleotide (T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wie sie im Handbuch von Newton und Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994) beschrieben ist, verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen rpsL-Allele können unter anderem auch durch das Verfahren des Genaustausches („gene replacement“), wie es bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) oder Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) beschrieben ist, in geeignete Stämme überführt werden. Das entsprechende rpsL-Allel wird hierbei in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor wie beispielsweise pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)) oder pCR@Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden „cross-over“-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden „cross-over“-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem rpsL-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls

regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren. Die Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

5 Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene beziehungsweise Nukleotidsequenzen und deren Allele.

So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Verstärkung des rpsL-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 10 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 15 • das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 20 • das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 25 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Kalinowski et al., Molecular Microbiologie 5(5), 1197-204 (1991)),

- das für das Lysin-Export-Protein kodierende Gen *lysE* (DE-A-195 48 222),
 - das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115), und
- 5 • das für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase B kodierende *rpoB*-Gen dargestellt in SEQ ID No. 5 und 6

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *rpsL*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

5 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Verstärkung des *rpsL*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: 10 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 15 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 20 (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise 25 den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren

wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
- 10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das
- 15 Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium
- 20 können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen
- 25 wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur
- 30 Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur
- 35 eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise

bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des Corynebacterium glutamicum Stammes DM1545 wurde am 16. Januar 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) als DSM 13992 gemäß Budapester Vertrag hinterlegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
5 wird wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)
beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI
(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell
gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit shrimp alkalischer
10 Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wird mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
20 dephosphoryliert.

Anschließend wird die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wird mit der
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wird anschließend mit Hilfe
des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla,
30 USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract,
Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) werden die Zellen
in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der

- Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank werden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
- 5 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert werden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des rpsL-Gens

- 10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wird mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem
- 15 Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente werden mit
- 20 shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgt die Isolierung der Cosmidfragmente im
- Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).
- Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande,
- 25 Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wird mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den
- 30 Sequenziervektor pZero-1 wird wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wird. Dieses Ligationsgemisch wird

anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 5 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgt mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgt nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings 10 of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wird der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

15 Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgt in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, 20 Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten werden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate werden zu einem 25 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wird mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergibt ein 30 offenes Leseraster von 383 Basenpaaren, welches als rpsL-Gen bezeichnet wird. Das rpsL-Gen kodiert für ein Protein von 127 Aminosäuren.

In gleicher Weise wurde der stromaufwärts von SEQ ID No. 1 gelegene DNA-Abschnitt identifiziert, der in SEQ ID No. 7

dargestellt ist. Die um SEQ ID No. 7 erweiterte rpsL-Genregion ist in SEQ ID No. 8 dargestellt.

Beispiel 3

Amplifikation und Sequenzierung der DNA des rpsL-Allels von
5 Stamm DM1545

Der Corynebacterium glutamicum Stamm DM1545 wurde durch mehrfache, ungerichtete Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl aus C. glutamicum ATCC13032 hergestellt. Der Stamm ist Methionin-sensitiv.

10 Aus dem Stamm DM1545 wird mit den üblichen Methoden (Eikmanns et al., Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wird ein DNA-Abschnitt amplifiziert, welcher das rpsL-Gen bzw. Allel trägt. Aufgrund der aus Beispiel 2
15 für C. glutamicum bekannten Sequenz des rpsL-Gens werden folgende Primer-Oligonukleotide für die PCR ausgewählt:

rpsL-1 (SEQ ID No. 10):

5' cag ctc tac aag agt gtc ta 3'

rpsL-2 (SEQ ID No. 11):

20 5' tgg tcg tgg tct tac cag ca 3'

Die dargestellten Primer werden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press)
25 die PCR-Reaktion durchgeführt. Die Primer ermöglichen die Amplifizierung eines ca. 1,78 kb langen DNA-Abschnittes, welcher das rpsL-Allel trägt.

Das amplifizierte DNA-Fragment von ca. 1,78 kb Länge, welches das rpsL-Allel des Stammes DM1545 trägt, wird durch
30 Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel identifiziert,

aus dem Gel isoliert und mit den üblichen Methoden aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden).

Die Nukleotidsequenz des amplifizierten DNA-Fragmentes bzw. PCR-Produktes wird von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) durch Sequenzierung ermittelt. Die Sequenz des PCR-Produktes ist in der SEQ ID No. 3 dargestellt. Die sich mit Hilfe des Programmes Patentin ergebende Aminosäuresequenz des dazugehörigen ribosomalen Proteins S12 ist in der SEQ ID No. 4 dargestellt.

10 An der Position 128 der Nukleotidsequenz der Kodierregion des rpsL-Allels von Stamm DM1545, also an Position 627 der in SEQ ID No. 3 dargestellten Nukleotidsequenz, befindet sich die Base Guanin. An der entsprechenden Position des Wildtypgens befindet sich die Base Adenin (SEQ ID No. 1).

An der Position 43 der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins S12 von Stamm DM1545 befindet sich die Aminosäure Arginin (SEQ ID No. 4). An der entsprechenden Position des Wildtyp-Proteins befindet sich die Aminosäure Lysin (SEQ ID No. 2).

Beispiel 4

Austausch des rpsL-Wildtypgens von Stamm DSM5715 gegen das rpsL-1545-Allel

4.1 Gewinnung eines DNA-Fragmentes, welches das rpsL-1545-Allel trägt

Aus dem Stamm DM1545 wird mit den üblichen Methoden (Eikmanns et al., Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wird ein DNA-Abschnitt amplifiziert, welcher das rpsL-1545-Allel trägt, bei dem an Position 128 des Kodierbereichs (CDS) die Base Guanin anstelle der an dieser Stelle im Wildtypgen enthaltenen Base Adenin enthalten ist.

Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des *rpsL* - Gens werden folgende Primer-Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion ausgewählt :

5 *rpsL_XL-A1* (SEQ ID No. 12):

5' ga tct aga-ggg tgc cgg taa tcc tgt tg 3'

rpsL_XL-E1 (SEQ ID No. 13):

5' ga tct aga-cgc agg ctg cca gct tat tc 3'

- Die dargestellten Primer werden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) die PCR Reaktion durchgeführt. Die Primer ermöglichen die Amplifizierung eines ca. 1,59 kb langen DNA-Abschnittes, welcher das *rpsL*-1545-Allel trägt (SEQ ID No. 9). Außerdem enthalten die Primer die Sequenz für eine Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *XbaI*, die in der oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert ist.
- Das amplifizierte DNA-Fragment von ca. 1,59 kb Länge, welches das *rpsL*-1545-Allel trägt, wird mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* gespalten, durch Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel identifiziert und anschließend aus dem Gel isoliert und mit den üblichen Methoden aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden).

4.2 Konstruktion des Austauschvektors pK18mobsacB_*rpsL*-1545

- Das in Beispiel 4.1 beschriebene ca. 1,58 kb lange, mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* gespaltene DNA-Fragment, welches das *rpsL*-1545-Allel enthält, wird mittels Austauschmutagenese unter Zuhilfenahme des bei Schäfer et al. (Gene, 14, 69-73 (1994)) beschriebenen sacB-Systems in

das Chromosom des *C. glutamicum* Stammes DSM5715 eingebaut. Dieses System ermöglicht die Herstellung bzw. die Selektion von Allel-Austauschen, die sich durch homologe Rekombination vollziehen.

- 5 Der mobilisierbare Klonierungsvektor pK18mobsacB wird mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut und die Enden mit alkalischer Phosphatase (Alkaline Phosphatase, Boehringer Mannheim, Deutschland) dephosphoryliert. Der so vorbereitete Vektor wird mit dem ca. 1,58 kb großen rpsL-
10 1545-Fragment gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) behandelt.

- Anschließend wird der *E. coli* Stamm S17-1 (Simon et al., Bio/Technologie 1: 784-791, 1993) mit dem Ligationsansatz transformiert (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical
15 Approach. Vol. 1, IRL-Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Die Selektion der Plasmid-tragenden Zellen erfolgt durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor, New York, 1989), der mit 25
20 mg/l Kanamycin supplementiert wurde.

- Plasmid-DNA wird aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym PstI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Das
25 Plasmid wird pK18mobsacB_rpsL-1545 genannt und ist in Figur 1 dargestellt.

4.3 Integration des Vektors pK18mobsacB_rpsL-1545 in DSM5715 und Allelaustausch

- Der in Beispiel 4.2 genannte Vektor pK18mobsacB_rpsL-1545
30 wird nach einem Protokoll von Schäfer et al. (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) in den *C. glutamicum* Stamm DSM5715 durch Konjugation transferiert. Der Vektor kann in DSM5715 nicht selbständig replizieren und bleibt

nur dann in der Zelle erhalten, wenn er als Folge eines Rekombinationsereignisses im Chromosom integriert vorliegt. Die Selektion von Transkonjuganten, d. h. von Klonen mit integriertem pK18mobsacB_rpsL-1545 erfolgt durch

5 Ausplattieren des Konjugationsansatzes auf LB-Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor, New York, 1989), der mit 15 mg/l Kanamycin und 50 mg/l Nalidixinsäure supplementiert wird. Kanamycin-resistente Transkonjuganten werden auf LB-

10 Agarplatten mit 25 mg/l Kanamycin ausgestrichen und für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Eine Kanamycin-resistente Transkonjugante wird als DSM5715::pK18mobsacB_rpsL-1545 bezeichnet. Durch Integration des Vektors trägt sie zusätzlich zum rpsL-Wildtypgen das rpsL-1545-Allel im

15 Chromosom.

Zur Selektion von Mutanten, bei denen als Folge eines zweiten Rekombinationsereignisses die Exzision des Plasmides stattgefunden hat, werden Zellen des Stammes DSM5715::pK18mobsacB_rpsL-1545 30 Stunden unselektiv in LB-

20 Flüssigmedium kultiviert, anschließend auf LB-Agar mit 10% Sucrose ausgestrichen und 16 Stunden bebrütet.

Das Plasmid pK18mobsacB_rpsL-1545 enthält ebenso wie das Ausgangsplasmid pK18mobsacB neben dem Kanamycin-Resistenzgen eine Kopie des für die Levan-Sucrase aus

25 Bacillus subtilis kodierenden sacB-Gens. Die durch Sucrose induzierbare Expression führt zur Bildung der Levan-Sucrase, die die Synthese des für C. glutamicum toxischen Produktes Levan katalysiert. Auf LB-Agar mit Sucrose wachsen daher nur solche Klone an, bei denen das

30 integrierte pK18mobsacB_rpsL-1545 als Folge eines zweiten Rekombinationsereignisses exzisiert hat. In Abhängigkeit von der Lage des zweiten Rekombinationsereignisses in bezug auf den Mutationsort findet bei der Exzision der Allelaustausch bzw. der Einbau der Mutation statt oder es

35 verbleibt die ursprüngliche Kopie im Chromosom des Wirtes.

Ungefähr 40 bis 50 Kolonien werden auf den Phänotyp „Wachstum in Gegenwart von Sucrose“ und „Nicht-Wachstum in Gegenwart von Kanamycin“ geprüft. Bei 4 Kolonien, die den Phänotyp „Wachstum in Gegenwart von Sucrose“ und „Nicht-Wachstum in Gegenwart von Kanamycin“ aufweisen, wird ein die rpsL-1545-Mutation überspannender Bereich des rpsL-Gens, ausgehend von dem Sequenzierprimer rL_1 (SEQ ID No. 14), von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) sequenziert, um nachzuweisen, dass die Mutation des rpsL-1545-Allels im Chromosom vorliegt. Der verwendete Primer rL_1 wird dazu von der Firma GATC synthetisiert:

rL_1 (SEQ ID No. 14):

5' atg agg ttg tcc gtg aca tg 3'

Auf diese Weise wurde ein Klon identifiziert, der an der Position 128 der Kodierregion (CDS) des rpsL-Gens die Base Guanin enthält und somit das rpsL-1545-Allel besitzt. Dieser Klon wurde als Stamm DSM5715_rpsL-1545 bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Die in Beispiel 4 erhaltenen *C. glutamicum* Stämme DSM5715::pK18mobsacB_rpsL-1545 und DSM5715rpsL-1545 werden in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu werden die Stämme zunächst auf Agarplatte für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wird je eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkulturen wird das Medium MM verwendet. Die Vorkulturen werden 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von diesen Vorkulturen wird je eine Hauptkultur angeimpft, so dass die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkulturen 0,1 OD beträgt. Für die Hauptkulturen wird ebenfalls das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
Salze:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
L-Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

- CSL (Corn Steep Liquor), MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die
- 5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Die Kultivierung erfolgt bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

- 10 Nach 72 Stunden wird die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH,

München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wird mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion
5 bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	8,2	13,57
DSM5715::pK18mobsacB _rpsL-1545	9,2	15,28
DSM5715rpsL-1545	7,9	14,74

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das rpsL-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des ribosomalen Proteins S12 aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass die Hybridisierung
10 unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das rpsL-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
9. Corynebacterium glutamicum Stamm DM1545 hinterlegt als DSM 13992 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig,
20 Deutschland).
10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende Schritte durchführt:
- 25 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das rpsL-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
- 30 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolierung der L-Aminosäure.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
verstärkt.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das rpsL-Gen kodierende
Nukleotidsequenz trägt.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression
des (der) Polynukleotids (e), das (die) für das rpsL-
Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
überexprimiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die
regulatorischen/katalytischen Eigenschaften des
Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das
Polynukleotid rpsL kodiert.
- 30 16. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen *dapA*,
- 16.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-
Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,
- 5 16.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende
Gen *tpi*,
- 16.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende
Gen *pgk*,
- 10 16.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
kodierende Gen *zwf*,
- 16.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 16.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen *mqo*,
- 15 16.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 16.9 das für das Lysin-Export-Protein kodierende Gen
lysE,
- 20 16.10 das für das *Zwa1*-Protein kodierende Gen *zwa1*,
- 16.11 das für die RNA-Polymerase B kodierende *rpoB*-
Gen

verstärkt bzw. überexprimiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
25 von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 17.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,
- 17.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen pgi,
- 5 17.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 17.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.
18. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
- 10 19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10-
17, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass
man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum
einsetzt.
- 15 20. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für das ribosomale Protein S12
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
rpsL-Gens aufweisen, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man das
20 Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen
gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als
Hybridisierungssonden einsetzt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 18, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man arrays, micro
25 arrays oder DNA-chips einsetzt.
22. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für
ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen
Aminosäuresequenzen zwischen den Positionen 38 bis 48
in der SEQ ID No. 2 durch Aminosäureaustausch verändert
30 sind.

23. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen an Position 43 in der SEQ ID No. 2 jede andere proteinogene Aminosäure ausgenommen L-Lysin enthalten.
- 5
24. Aus coryneformen Bakterien stammende DNA, kodierend für ribosomale S12 Proteine, wobei die zugehörigen Aminosäuresequenzen an Position 43 in der SEQ ID No. 2 L-Histidin oder L-Arginin enthalten.
- 10 25. DNA gemäß Anspruch 24 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass diese für das ribosomale Protein S12 kodiert, dessen Aminosäuresequenz an Position 43 L-Arginin enthält, dargestellt in SEQ ID No. 4.
- 15 26. DNA gemäß Anspruch 25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass diese an Position 128 des Kodierbereichs, entsprechend der Position 627 der in SEQ ID No. 3 dargestellten Sequenz, die Nukleobase Guanin enthält.
- 20 27. Coryneforme Bakterien die eine DNA gemäß Anspruch 22, 23, 24, 25 oder 26 enthalten.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das rpsL-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

5 ggt gtc cgt tac aag atc gtc cgt ggc gca ctg gat acc cag ggt gtt 820
 Gly Val Arg Tyr Lys Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val
 95 100 105

aag gac cgc aag cag gct cgt tcc ccg cta cgg cgc gaa gag ggg ata 868
 Lys Asp Arg Lys Gln Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile
 110 115 120

10 att aaa aat gcg taaatcagca gtcctaagc gtccagtagt tcaggaccct 920
 Ile Lys Asn Ala
 125

15 gtatacaagt ccgagctcgt taccagctc gtaaacaaga tcctcatcgg tggcaagaag 980
 tccaccgcag agcgcatcgt ctacggtgca ctcgagatct gccgtgagaa gaccggcacc 1040
 gatccagtag gaaccctcga gaaggctctc ggcaacgtgc gtccagacct cgaagttcgt 1100

20 tcccgcctgt ttggtggcgc tacctaccag gtgccagtggt atgttcgccc agagcgcgca 1160
 aacaccctcg cactgcgttg gttggttaacc ttcaccgcgc agcgtcgtga gaacaccatg 1220
 atcgagcgtc ttgcaaacga acttctggat gcagccaacg gccttggcgc ttccgtgaag 1280

25 cgtcgcgaag acaccacaa gatggcagag gccaacgcgc ccttcgctca ctaccgctgg 1340
 tagtactgcc aagacatgaa agcccaatca cttttaagat caacgcctgc cggcgccctt 1400

30 cacatttgaa taagctggca gcctgcgttt cttcaaggcg actgggcttt tagtctcatt 1460
 aatgcagttc accgctgtaa gatagctaaa tagaaacact gtttcggcag tgtgttacta 1520

35 aaaaatccat gtcaettgcc tcgagcgtgc tgcttgaatc gcaagttagt ggcaaatgt 1580
 aacaagagaa ttatccgtag gtgacaaact ttttaatact tgggtatctg tcatggatac 1640
 cccggtaata aataagttaa ttaccgtaac caacaagttg gggtagcact gtggcacaag 1700

40 aagtgttaa ggatctaaac aaggtccgca acatcggcat catggcgcac atcgatgctg 1760
 gtaagaccac gacca 1775

45 <210> 2
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <400> 2
 Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly Arg His Asp Lys Ser
 1 5 10 15

55 Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser Pro Gln Arg Arg Gly
 20 25 30

Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Thr Pro Lys Lys Pro Asn Ser Ala
 35 40 45

60 Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser Gly Ile Glu Val Ser
 50 55 60

Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Met Val
65 70 75 80

5 Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr Lys
85 90 95

Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val Lys Asp Arg Lys Gln
100 105 110

10 Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile Ile Lys Asn Ala
115 120 125

<210> 3
15 <211> 1775
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
20 <221> CDS
<222> (500)..(880)
<223> rpsL-1545-Allel

<220>
25 <221> mutation
<222> (627)..(627)
<223> Austausch von Adenin gegen Guanin

<400> 3
30 cagctctaca agagtgtcta agtggcgggc attccatgct ttggaggagc gatcttcaaa 60
ttctctcaaa gtgagttgac ctcggaagac agctgcagaa agttcatcca cgacttggtt 120
tcggttaagg tcagtggcga gcttctttgc tggttcggtt ccttgaggaa cagtcattggg 180
35 aaccattcta acaagggtatt tgggtgtttc tgcggctagc tgataatgtg aacggctgag 240
tccactctt gtagttggga attgacggca cctcgcactc aagcgcggta tcgcccctgg 300
40 ttttccggga cgcggtggcg catgtttgca tttgatgagg ttgtccgtga catgtttggt 360
cgggcccaaa aaagagcccc cttttttgcg tgtctggaca ctttttcaaa tccttcgcca 420
tcgacaagct cagccttcgt gttcgctccc cgggcgtcac gtcagcagtt aaagaacaac 480
45 tccgaaataa ggatggttc atg cca act att cag cag ctg gtc cgt aag ggc 532
Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly
1 5 10

50 cgc cac gat aag tcc gcc aag gtg gct acc gcg gca ctg aag ggt tcc 580
Arg His Asp Lys Ser Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser
15 20 25

cct cag cgt cgt ggc gta tgc acc cgt gtg tac acc acc acc cct agg 628
55 Pro Gln Arg Arg Gly Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Pro Arg
30 35 40

aag cct aac tct gct ctt cgt aag gtc gct cgt gtg cgc ctt acc tcc 676
60 Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser
45 50 55

ggc atc gag gtt tcc gct tac atc cct ggt gag ggc cac aac ctg cag 724

Gly Ile Glu Val Ser Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln
 60 65 70 75
 5 gag cac tcc atg gtg ctc gtt cgc ggt ggt cgt gtt aag gac ctc cca 772
 Glu His Ser Met Val Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro
 80 85 90
 10 ggt gtc cgt tac aag atc gtc cgt ggc gca ctg gat acc cag ggt gtt 820
 Gly Val Arg Tyr Lys Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val
 95 100 105
 15 aag gac cgc aag cag gct cgt tcc ccg cta cgg cgc gaa gag ggg ata 868
 Lys Asp Arg Lys Gln Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile
 110 115 120
 att aaa aat gcg taaatcagca gctcctaagc gtccagtagt tcaggaccct 920
 Ile Lys Asn Ala
 125
 20 gtatacaagt ccgagctcgt taccagctc gtaaacaaga tctcatcgg tggcaagaag 980
 tccaccgcag agcgcatcgt ctacgggtgca ctcgagatct gccgtgagaa gaccggcacc 1040
 gatccagtag gaaccctcga gaaggctctc ggcaacgtgc gtccagacct cgaagtctgt 1100
 25 tcccgccgtg ttggtggcgc tacctaccag gtgccagtgg atgttcgccc agagcgcgca 1160
 aacaccctcg cactgcgttg gttggttaacc ttcaccgctc agcgtcgtga gaacaccatg 1220
 30 atcgagcgtc ttgcaaacga acttctggat gcagccaacg gccttggcgc ttccgtgaag 1280
 cgtcgcgaag acaccacaa gatggcagag gccaacgcg ccttcgctca ctaccgctgg 1340
 tagtactgcc aagacatgaa agcccaatca cctttaagat caacgcctgc cggcgccctt 1400
 35 cacatttgaa taagctggca gcctgcgttt ctcaaggcg actgggcttt tagtctcatt 1460
 aatgcagttc accgctgtaa gatagctaaa tagaaacact gtttcggcag tgtgttacta 1520
 40 aaaaatccat gtcacttgcc tcgagcgtgc tgcttgaatc gcaagttagt ggcaaaatgt 1580
 aacaagagaa ttatccgtag gtgacaaact ttttaatact tgggtatctg tcatggatac 1640
 cccggttaata aataagtga ttaccgtaac caacaagttg gggtaccact gtggcacaag 1700
 45 aagtgttaaa ggatctaaac aaggtccgca acatcgcat catggcgcac atcgatgctg 1760
 gtaagaccac gacca 1775
 50
 <210> 4
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 55
 <400> 4
 Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly Arg His Asp Lys Ser
 1 5 10 15
 60 Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser Pro Gln Arg Arg Gly
 20 25 30

Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Thr Pro Arg Lys Pro Asn Ser Ala
 35 40 45

5 Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser Gly Ile Glu Val Ser
 50 55 60

Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Met Val
 65 70 75 80

10 Leu Val Arg Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr Lys
 85 90 95

Ile Val Arg Gly Ala Leu Asp Thr Gln Gly Val Lys Asp Arg Lys Gln
 100 105 110

15 Ala Arg Ser Pro Leu Arg Arg Glu Glu Gly Ile Ile Lys Asn Ala
 115 120 125

<210> 5
 20 <211> 5099
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 25 <221> CDS
 <222> (702)..(4196)
 <223> rpoB-Gen

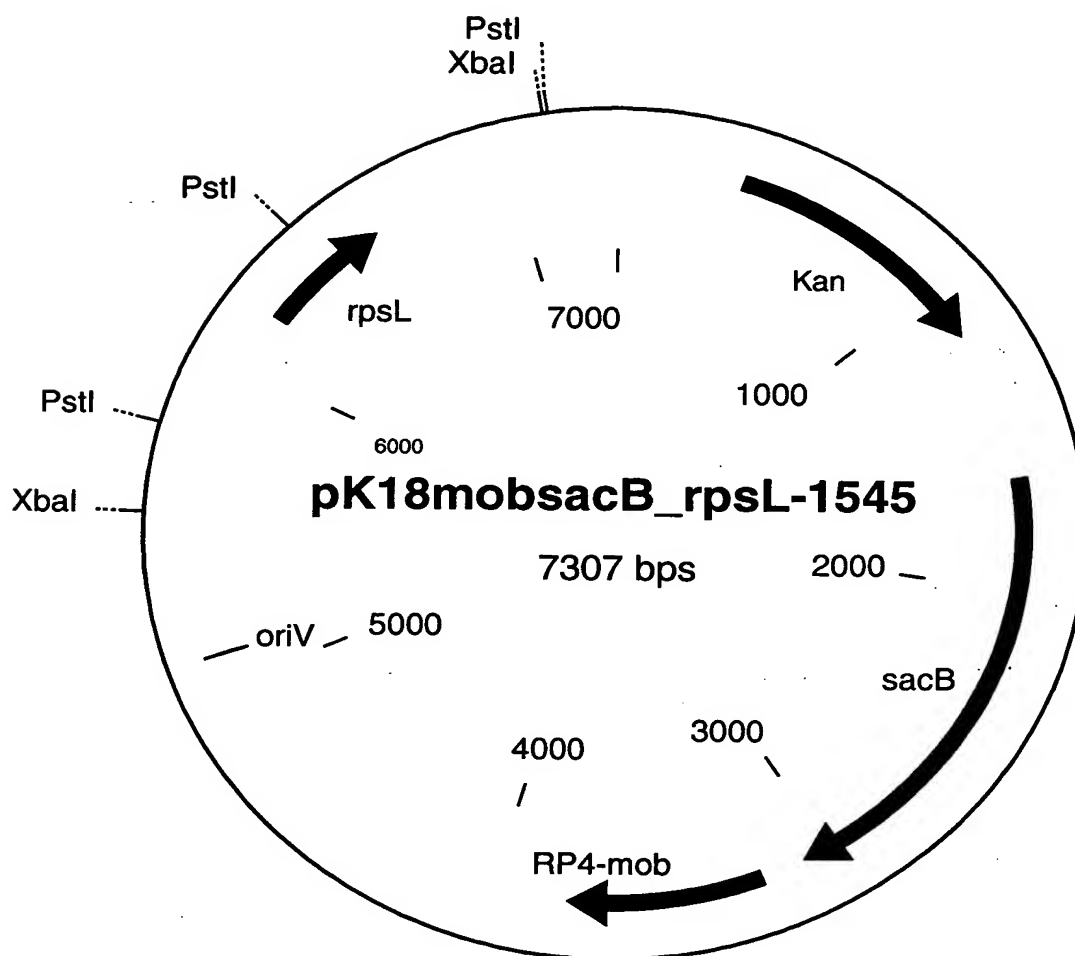
<400> 5
 30 acaatgtgac tcgtgatttt tgggtggatc agcgtaccgg tttggttgct gatctagctg 60
 aaaatattga tgattttttac ggcgaccgca gcgccagaa gtacgaacag aaattgcttt 120
 tcgacgcctc cctcgacgat gcagctgtct ctaagctggg tgcacaggcc gaaagcatcc 180
 35 ctgatggaga tgtgagcaaa atcgcaaata ccgtaggtat tgtgatcggg gcggtattgg 240
 ctctcgtggg cctggccggg tgttttggg cgtttgggaa gaaacgtcga gaagcttaac 300
 40 ctgctgttca aatagatttt ccctgtttcg aattgcggaa accccgggtt tgtttgctag 360
 ggtgcctcgt agaaggggtc aagaagattt ctgggaaacg cgcccgtgcg gttggttgct 420
 aatagcacgc ggagcaccag atgaaaaatc tcccctttac tttcgcgcg gattgggtata 480
 45 ctctgagtcg ttgcgttgga attcgtgact ctttttcggt cctgtagcgc caagaccttg 540
 atcaaggtgg tttaaaaaaa ccgatttgac aaggtcattc agtgctatct ggagtcgttc 600
 50 agggggatcg ggttcctcag cagaccaatt gctcaaaaat accagcgggtg ttgatctgca 660
 cttaatggcc ttgaccagcc aggtgcaatt acccgcgatg g gtg ctg gaa gga ccc 716
 Met Leu Glu Gly Pro
 1 5

55 atc ttg gca gtc tcc cgc cag acc aag tca gtc gtc gat att ccc ggt 764
 Ile Leu Ala Val Ser Arg Gln Thr Lys Ser Val Val Asp Ile Pro Gly
 10 15 20

60 gca ccg cag cgt tat tct ttc gcg aag gtg tcc gca ccc att gag gtg 812
 Ala Pro Gln Arg Tyr Ser Phe Ala Lys Val Ser Ala Pro Ile Glu Val
 25 30 35

5	ccc ggg cta cta gat ctt caa ctg gat tct tac tcc tgg ctg att ggt Pro Gly Leu Leu Asp Leu Gln Leu Asp Ser Tyr Ser Trp Leu Ile Gly 40 45 50	860
10	acg cct gag tgg cgt gct cgt cag aag gaa gaa ttc ggc gag gga gcc Thr Pro Glu Trp Arg Ala Arg Gln Lys Glu Glu Phe Gly Glu Gly Ala 55 60 65	908
15	cgc gta acc agc ggc ctt gag aac att ctc gag gag ctc tcc cca atc Arg Val Thr Ser Gly Leu Glu Asn Ile Leu Glu Glu Leu Ser Pro Ile 70 75 80 85	956
20	cag gat tac tct gga aac atg tcc ctg agc ctt tcg gag cca cgc ttc Gln Asp Tyr Ser Gly Asn Met Ser Leu Ser Leu Ser Glu Pro Arg Phe 90 95 100	1004
25	gaa gac gtc aag aac acc att gac gag gcg aaa gaa aag gac atc aac Glu Asp Val Lys Asn Thr Ile Asp Glu Ala Lys Glu Lys Asp Ile Asn 105 110 115	1052
30	tac gcg gcg cca ctg tat gtg acc gcg gag ttc gtc aac aac acc acc Tyr Ala Ala Pro Leu Tyr Val Thr Ala Glu Phe Val Asn Asn Thr Thr 120 125 130	1100
35	ggt gaa atc aag tct cag act gtc ttc atc ggc gat ttc cca atg atg Gly Glu Ile Lys Ser Gln Thr Val Phe Ile Gly Asp Phe Pro Met Met 135 140 145	1148
40	acg gac aag gga acg ttc atc atc aac gga acc gaa cgc gtt gtg gtc Thr Asp Lys Gly Thr Phe Ile Ile Asn Gly Thr Glu Arg Val Val Val 150 155 160 165	1196
45	agc cag ctc gtc cgc tcc ccg ggc gtg tac ttt gac cag acc atc gat Ser Gln Leu Val Arg Ser Pro Gly Val Tyr Phe Asp Gln Thr Ile Asp 170 175 180	1244
50	aag tca act gag cgt cca ctg cac gcc gtg aag gtt att cct tcc cgt Lys Ser Thr Glu Arg Pro Leu His Ala Val Lys Val Ile Pro Ser Arg 185 190 195	1292
55	ggt gct tgg ctt gag ttt gac gtc gat aag cgc gat tcg gtt ggt gtt Gly Ala Trp Leu Glu Phe Asp Val Asp Lys Arg Asp Ser Val Gly Val 200 205 210	1340
60	cgt att gac cgc aag cgt cgc cag cca gtc acc gta ctg ctg aag gct Arg Ile Asp Arg Lys Arg Arg Gln Pro Val Thr Val Leu Leu Lys Ala 215 220 225	1388
65	ctt ggc tgg acc act gag cag atc acc gag cgt ttc ggt ttc tct gaa Leu Gly Trp Thr Thr Glu Gln Ile Thr Glu Arg Phe Gly Phe Ser Glu 230 235 240 245	1436
70	atc atg atg tcc acc ctc gag tcc gat ggt gta gca aac acc gat gag Ile Met Met Ser Thr Leu Glu Ser Asp Gly Val Ala Asn Thr Asp Glu 250 255 260	1484
75	gca ttg ctg gag atc tac cgc aag cag cgt cca ggc gag cag cct acc Ala Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Lys Gln Arg Pro Gly Glu Gln Pro Thr 265 270 275	1532

Figur 1: Plasmid pK18mobsacB_rpsL-1545



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Für das rpsL-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000779 BT

<160> 12

10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1775

15

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

20

<222> (500)..(880)

<223> rpsL-Wildtypgen

<400> 1

25

cagctctaca agagtgtcta agtggcgggc attccatgct ttggaggagc gatcttcaaa 60

ttcctccaaa gtgagttgac ctcggaac agctgcagaa agttcatcca cgacttggtt 120

tcgggttaagg tcagtggcga gcttctttgc tggttcggtt ccttgaggaa cagtcattggg 180

30

aaccattcta acaagggtt tgggtgtttc tgcggctagc tgataatgtg aacggctgag 240

tcccactctt gtagttggga attgacggca cctgcactc aagcgcggtg tcgcccctgg 300

ttttccggga cgcgggtggc catgtttgca tttgatgagg ttgtccgtga catgtttggt 360

35

cgggcccaaa aaagagcccc cttttttgcg tgtctggaca ctttttcaaa tccttcgcca 420

tcgacaagct cagccttcgt gttcgtcccc cgggcgtcac gtcagcagtt aaagaacaac 480

40

tccgaaataa ggatgggtc atg cca act att cag cag ctg gtc cgt aag ggc 532

Met Pro Thr Ile Gln Gln Leu Val Arg Lys Gly
1 5 10

45

cgc cac gat aag tcc gcc aag gtg gct acc gcg gca ctg aag ggt tcc 580
Arg His Asp Lys Ser Ala Lys Val Ala Thr Ala Ala Leu Lys Gly Ser
15 20 25

50

cct cag cgt cgt ggc gta tgc acc cgt gtg tac acc acc acc cct aag 628
Pro Gln Arg Arg Gly Val Cys Thr Arg Val Tyr Thr Thr Thr Pro Lys
30 35 40

55

aag cct aac tct gct ctt cgt aag gtc gct cgt gtg cgc ctt acc tcc 676
Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys Val Ala Arg Val Arg Leu Thr Ser
45 50 55

60

ggc atc gag gtt tcc gct tac atc cct ggt gag ggc cac aac ctg cag 724
Gly Ile Glu Val Ser Ala Tyr Ile Pro Gly Glu Gly His Asn Leu Gln
60 65 70 75gag cac tcc atg gtg ctc gtt cgc ggt ggt cgt gtt aag gac ctc cca 772
Glu His Ser Met Val Leu Val Arg Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro
80 85 90

	cgc gac ctt gcg cag tcc ctc ctg gac aac agc ttc ttc cgt gca aag	1580
	Arg Asp Leu Ala Gln Ser Leu Leu Asp Asn Ser Phe Phe Arg Ala Lys	
	280 285 290	
5	cgc tac gac ctg gct cgc gtt ggt cgt tac aag atc aac cgc aag ctc	1628
	Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Arg Tyr Lys Ile Asn Arg Lys Leu	
	295 300 305	
10	ggc ctt ggt ggc gac cac gat ggt ttg atg act ctt act gaa gag gac	1676
	Gly Leu Gly Gly Asp His Asp Gly Leu Met Thr Leu Thr Glu Glu Asp	
	310 315 320 325	
15	atc gca acc acc atc gag tac ctg gtg cgt ctg cac gca ggt gag cgc	1724
	Ile Ala Thr Thr Ile Glu Tyr Leu Val Arg Leu His Ala Gly Glu Arg	
	330 335 340	
20	gtc atg act tct cca aat ggt gaa gag atc cca gtc gag acc gat gac	1772
	Val Met Thr Ser Pro Asn Gly Glu Glu Ile Pro Val Glu Thr Asp Asp	
	345 350 355	
25	atc gac cac ttt ggt aac cgt cgt ctg cgt acc gtt ggc gaa ctg atc	1820
	Ile Asp His Phe Gly Asn Arg Arg Leu Arg Thr Val Gly Glu Leu Ile	
	360 365 370	
30	cag aac cag gtc cgt gtc ggc ctg tcc cgc atg gag cgc gtt gtt cgt	1868
	Gln Asn Gln Val Arg Val Gly Leu Ser Arg Met Glu Arg Val Val Arg	
	375 380 385	
35	gag cgt atg acc acc cag gat gcg gag tcc att act cct act tcc ttg	1916
	Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ala Glu Ser Ile Thr Pro Thr Ser Leu	
	390 395 400 405	
40	atc aac gtt cgt cct gtc tct gca gct atc cgt gag ttc ttc gga act	1964
	Ile Asn Val Arg Pro Val Ser Ala Ala Ile Arg Glu Phe Phe Gly Thr	
	410 415 420	
45	tcc cag ctg tct cag ttc atg gtc cag aac aac tcc ctg tct ggt ttg	2012
	Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Val Gln Asn Asn Ser Leu Ser Gly Leu	
	425 430 435	
50	act cac aag cgt cgt ctg tcg gct ctg ggc ccg ggt ggt ctg tcc cgt	2060
	Thr His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu Gly Pro Gly Gly Leu Ser Arg	
	440 445 450	
55	gag cgc gcc ggc atc gag gtt cga gac gtt cac cca tct cac tac ggc	2108
	Glu Arg Ala Gly Ile Glu Val Arg Asp Val His Pro Ser His Tyr Gly	
	455 460 465	
60	cgt atg tgc cca att gag act ccg gaa ggt cca aac att ggc ctg atc	2156
	Arg Met Cys Pro Ile Glu Thr Pro Glu Gly Pro Asn Ile Gly Leu Ile	
	470 475 480 485	
65	ggt tcc ttg gct tcc tat gct cga gtg aac cca ttc ggt ttc att gag	2204
	Gly Ser Leu Ala Ser Tyr Ala Arg Val Asn Pro Phe Gly Phe Ile Glu	
	490 495 500	
70	acc cca tac cgt cgc atc atc gac ggc aag ctg acc gac cag att gac	2252
	Thr Pro Tyr Arg Arg Ile Ile Asp Gly Lys Leu Thr Asp Gln Ile Asp	
	505 510 515	

	tac ctt acc gct gat gag gaa gac cgc ttc gtt gtt gcg cag gca aac	2300
	Tyr Leu Thr Ala Asp Glu Glu Asp Arg Phe Val Val Ala Gln Ala Asn	
	520 525 530	
5	acg cac tac gac gaa gag ggc aac atc acc gat gag acc gtc act gtt	2348
	Thr His Tyr Asp Glu Glu Gly Asn Ile Thr Asp Glu Thr Val Thr Val	
	535 540 545	
10	cgt ctg aag gac ggc gac atc gcc atg gtt ggc cgc aac gcg gtt gat	2396
	Arg Leu Lys Asp Gly Asp Ile Ala Met Val Gly Arg Asn Ala Val Asp	
	550 555 560 565	
15	tac atg gac gtt tcc cct cgt cag atg gtt tct gtt ggt acc gcg atg	2444
	Tyr Met Asp Val Ser Pro Arg Gln Met Val Ser Val Gly Thr Ala Met	
	570 575 580	
20	att cca ttc ctg gag cac gac gat gct aac cgt gca ctg atg ggc gcg	2492
	Ile Pro Phe Leu Glu His Asp Asp Ala Asn Arg Ala Leu Met Gly Ala	
	585 590 595	
	aac atg cag aag cag gct gtg cca ctg att cgt gcc gag gct cct ttc	2540
	Asn Met Gln Lys Gln Ala Val Pro Leu Ile Arg Ala Glu Ala Pro Phe	
	600 605 610	
25	gtg ggc acc ggt atg gag cag cgc gca gca tac gac gcc ggc gac ctg	2588
	Val Gly Thr Gly Met Glu Gln Arg Ala Ala Tyr Asp Ala Gly Asp Leu	
	615 620 625	
30	gtt att acc cca gtc gca ggt gtg gtg gaa aac gtt tca gct gac ttc	2636
	Val Ile Thr Pro Val Ala Gly Val Val Glu Asn Val Ser Ala Asp Phe	
	630 635 640 645	
35	atc acc atc atg gct gat gac ggc aag cgc gaa acc tac ctg ctg cgt	2684
	Ile Thr Ile Met Ala Asp Asp Gly Lys Arg Glu Thr Tyr Leu Leu Arg	
	650 655 660	
40	aag ttc cag cgc acc aac cag ggc acc agc tac aac cag aag cct ttg	2732
	Lys Phe Gln Arg Thr Asn Gln Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Pro Leu	
	665 670 675	
	gtt aac ttg ggc gag cgc gtt gaa gct ggc cag gtt att gct gat ggt	2780
	Val Asn Leu Gly Glu Arg Val Glu Ala Gly Gln Val Ile Ala Asp Gly	
	680 685 690	
45	cca ggt acc ttc aat ggt gaa atg tcc ctt ggc cgt aac ctt ctg gtt	2828
	Pro Gly Thr Phe Asn Gly Glu Met Ser Leu Gly Arg Asn Leu Leu Val	
	695 700 705	
50	gcg ttc atg cct tgg gaa ggc cac aac tac gag gat gcg atc atc ctc	2876
	Ala Phe Met Pro Trp Glu Gly His Asn Tyr Glu Asp Ala Ile Ile Leu	
	710 715 720 725	
55	aac cag aac atc gtt gag cag gac atc ttg acc tcg atc cac atc gag	2924
	Asn Gln Asn Ile Val Glu Gln Asp Ile Leu Thr Ser Ile His Ile Glu	
	730 735 740	
60	gag cac gag atc gat gcc cgc gac act aag ctt ggc gcc gaa gaa atc	2972
	Glu His Glu Ile Asp Ala Arg Asp Thr Lys Leu Gly Ala Glu Glu Ile	
	745 750 755	

	acc cgc gac atc cct aat gtg tct gaa gaa gtc ctc aag gac ctc gac	3020
	Thr Arg Asp Ile Pro Asn Val Ser Glu Glu Val Leu Lys Asp Leu Asp	
	760 765 770	
5	gac cgc ggt att gtc cgc atc ggt gct gat gtt cgt gac ggc gac atc	3068
	Asp Arg Gly Ile Val Arg Ile Gly Ala Asp Val Arg Asp Gly Asp Ile	
	775 780 785	
10	ctg gtc ggt aag gtc acc cct aag ggc gag acc gag ctc acc ccg gaa	3116
	Leu Val Gly Lys Val Thr Pro Lys Gly Glu Thr Glu Leu Thr Pro Glu	
	790 795 800 805	
15	gag cgc ttg ctg cgc gca atc ttc ggt gag aag gcc cgc gaa gtt cgc	3164
	Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile Phe Gly Glu Lys Ala Arg Glu Val Arg	
	810 815 820	
20	gat acc tcc atg aag gtg cct cac ggt gag acc ggc aag gtc atc ggc	3212
	Asp Thr Ser Met Lys Val Pro His Gly Glu Thr Gly Lys Val Ile Gly	
	825 830 835	
25	gtg cgt cac ttc tcc cgc gag gac gac gac gat ctg gct cct ggc gtc	3260
	Val Arg His Phe Ser Arg Glu Asp Asp Asp Asp Leu Ala Pro Gly Val	
	840 845 850	
30	aac gag atg atc cgt atc tac gtt gct cag aag cgt aag atc cag gac	3308
	Asn Glu Met Ile Arg Ile Tyr Val Ala Gln Lys Arg Lys Ile Gln Asp	
	855 860 865	
35	ggc gat aag ctc gct ggc cgc cac ggt aac aag ggt gtt gtc ggt aaa	3356
	Gly Asp Lys Leu Ala Gly Arg His Gly Asn Lys Gly Val Val Gly Lys	
	870 875 880 885	
40	att ttg cct cag gaa gat atg cca ttc ctt cca gac ggc act cct gtt	3404
	Ile Leu Pro Gln Glu Asp Met Pro Phe Leu Pro Asp Gly Thr Pro Val	
	890 895 900	
45	gac atc atc ttg aac acc cac ggt gtt cca cgt cgt atg aac att ggt	3452
	Asp Ile Ile Leu Asn Thr His Gly Val Pro Arg Arg Met Asn Ile Gly	
	905 910 915	
50	cag gtt ctt gag acc cac ctt ggc tgg ctg gca tct gct ggt tgg tcc	3500
	Gln Val Leu Glu Thr His Leu Gly Trp Leu Ala Ser Ala Gly Trp Ser	
	920 925 930	
55	gtg gat cct gaa gat cct gag aac gct gag ctc gtc aag act ctg cct	3548
	Val Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asn Ala Glu Leu Val Lys Thr Leu Pro	
	935 940 945	
60	gca gac ctc ctc gag gtt cct gct ggt tcc ttg act gca act cct gtg	3596
	Ala Asp Leu Leu Glu Val Pro Ala Gly Ser Leu Thr Ala Thr Pro Val	
	950 955 960 965	
65	ttc gac ggt gcg tca aac gaa gag ctc gca ggc ctg ctc gct aat tca	3644
	Phe Asp Gly Ala Ser Asn Glu Glu Leu Ala Gly Leu Leu Ala Asn Ser	
	970 975 980	
70	cgt cca aac cgc gac ggc gac gtc atg gtt aac gcg gat ggt aaa gca	3692
	Arg Pro Asn Arg Asp Gly Asp Val Met Val Asn Ala Asp Gly Lys Ala	
	985 990 995	

	acg ctt atc	gac ggt cgc tcc ggt	gag cct tac ccg tac	ccg gtt	3737
	Thr Leu Ile	Asp Gly Arg Ser Gly	Glu Pro Tyr Pro Tyr	Pro Val	
	1000	1005	1010		
5	tcc atc ggc	tac atg tac atg ctg	aag ctg cac cac ctc	gtt gac	3782
	Ser Ile Gly	Tyr Met Tyr Met Leu	Lys Leu His His Leu	Val Asp	
	1015	1020	1025		
10	gag aag atc	cac gca cgt tcc act	ggt cct tac tcc atg	att acc	3827
	Glu Lys Ile	His Ala Arg Ser Thr	Gly Pro Tyr Ser Met	Ile Thr	
	1030	1035	1040		
15	cag cag cca	ctg ggt ggt aaa gca	cag ttc ggt gga cag	cgt ttc	3872
	Gln Gln Pro	Leu Gly Gly Lys Ala	Gln Phe Gly Gly Gln	Arg Phe	
	1045	1050	1055		
20	ggc gaa atg	gag gtg tgg gca atg	cag gca tac ggc gct	gcc tac	3917
	Gly Glu Met	Glu Val Trp Ala Met	Gln Ala Tyr Gly Ala	Ala Tyr	
	1060	1065	1070		
	aca ctt cag	gag ctg ctg acc atc	aag tct gat gac gtg	gtt ggc	3962
	Thr Leu Gln	Glu Leu Leu Thr Ile	Lys Ser Asp Asp Val	Val Gly	
	1075	1080	1085		
25	cgt gtc aag	gtc tac gaa gca att	gtg aag ggc gag aac	atc ccg	4007
	Arg Val Lys	Val Tyr Glu Ala Ile	Val Lys Gly Glu Asn	Ile Pro	
	1090	1095	1100		
30	gat cca ggt	att cct gag tcc ttc	aag gtt ctc ctc aag	gag ctc	4052
	Asp Pro Gly	Ile Pro Glu Ser Phe	Lys Val Leu Leu Lys	Glu Leu	
	1105	1110	1115		
35	cag tcc ttg	tgc ctg aac gtg gag	gtt ctc tcc gca gac	ggc act	4097
	Gln Ser Leu	Cys Leu Asn Val Glu	Val Leu Ser Ala Asp	Gly Thr	
	1120	1125	1130		
40	cca atg gag	ctc gcg ggt gac gac	gac gac ttc gat cag	gca ggc	4142
	Pro Met Glu	Leu Ala Gly Asp Asp	Asp Asp Phe Asp Gln	Ala Gly	
	1135	1140	1145		
	gcc tca ctt	ggc atc aac ctg tcc	cgt gac gag cgt tcc	gac gcc	4187
	Ala Ser Leu	Gly Ile Asn Leu Ser	Arg Asp Glu Arg Ser	Asp Ala	
	1150	1155	1160		
45	gac acc gca	tagcagatca gaaaacaacc	gctagaaaatc aagccataca		4236
	Asp Thr Ala	1165			
50	tcccccgac	attgaagaga tggtctgggg	ggaaagggag ttttacgtgc	tcgacgtaaa	4296
	cgtcttcgat	gagctccgca tcggcctggc	caccgccgac gacatccgcc	gttggtccaa	4356
	gggtgaggtc	aagaagccgg agaccatcaa	ctaccgaacc ctcaagcctg	agaaggacgg	4416
55	tctgttctgc	gagcgtatct tcgggtccaac	tcgcgactgg gagtgcgcct	gcggtaagta	4476
	caagcgtgtc	cgctacaagg gcatcatctg	tgaacgctgt ggcgttgagg	tcaccaagtc	4536
60	caaggtgctc	cgtgagcgca tgggacacat	tgagctcgct gcaccagtaa	cccacatttg	4596
	gtacttcaag	ggcgttccat cagcctcgg	ctaccttttg gaccttgctc	caaaggacct	4656

ggacctcatc atctacttcg gtgcgaacat catcaccagc gtggacgaag aggctcgcca 4716
 cagcgaccag accactcttg aggcagaaat gcttctggag aagaaggacg ttgaggcaga 4776
 5 cgcagagtct gacattgctg agcgtgctga aaagctcgaa gaggatcttg ctgaacttga 4836
 ggcagctggc gctaaggccg acgctcgccg caagggttcag gctgctgccg ataaggaaat 4896
 10 gcagcacatc cgtgagcgtg cacagcgca aatcgatcgt ctgatgagg tctggcagac 4956
 cttcatcaag cttgctccaa agcagatgat ccgcatgag aagctctacg atgaactgat 5016
 cgaccgctac gaggattact tcaccggtgg tatgggtgca gaggccattg aggctttgat 5076
 15 ccagaacttc gaccttgatg ctg 5099

<210> 6
 <211> 1165
 20 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <400> 6
 25 Met Leu Glu Gly Pro Ile Leu Ala Val Ser Arg Gln Thr Lys Ser Val
 1 5 10 15
 Val Asp Ile Pro Gly Ala Pro Gln Arg Tyr Ser Phe Ala Lys Val Ser
 20 25 30
 30 Ala Pro Ile Glu Val Pro Gly Leu Leu Asp Leu Gln Leu Asp Ser Tyr
 35 40 45
 Ser Trp Leu Ile Gly Thr Pro Glu Trp Arg Ala Arg Gln Lys Glu Glu
 50 55 60
 35 Phe Gly Glu Gly Ala Arg Val Thr Ser Gly Leu Glu Asn Ile Leu Glu
 65 70 75 80
 40 Glu Leu Ser Pro Ile Gln Asp Tyr Ser Gly Asn Met Ser Leu Ser Leu
 85 90 95
 Ser Glu Pro Arg Phe Glu Asp Val Lys Asn Thr Ile Asp Glu Ala Lys
 100 105 110
 45 Glu Lys Asp Ile Asn Tyr Ala Ala Pro Leu Tyr Val Thr Ala Glu Phe
 115 120 125
 Val Asn Asn Thr Thr Gly Glu Ile Lys Ser Gln Thr Val Phe Ile Gly
 130 135 140
 50 Asp Phe Pro Met Met Thr Asp Lys Gly Thr Phe Ile Ile Asn Gly Thr
 145 150 155 160
 Glu Arg Val Val Val Ser Gln Leu Val Arg Ser Pro Gly Val Tyr Phe
 165 170 175
 55 Asp Gln Thr Ile Asp Lys Ser Thr Glu Arg Pro Leu His Ala Val Lys
 180 185 190
 60 Val Ile Pro Ser Arg Gly Ala Trp Leu Glu Phe Asp Val Asp Lys Arg
 195 200 205

Asp Ser Val Gly Val Arg Ile Asp Arg Lys Arg Arg Gln Pro Val Thr
 210 215 220
 5 Val Leu Leu Lys Ala Leu Gly Trp Thr Thr Glu Gln Ile Thr Glu Arg
 225 230 235 240
 Phe Gly Phe Ser Glu Ile Met Met Ser Thr Leu Glu Ser Asp Gly Val
 245 250 255
 10 Ala Asn Thr Asp Glu Ala Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Lys Gln Arg Pro
 260 265 270
 Gly Glu Gln Pro Thr Arg Asp Leu Ala Gln Ser Leu Leu Asp Asn Ser
 275 280 285
 15 Phe Phe Arg Ala Lys Arg Tyr Asp Leu Ala Arg Val Gly Arg Tyr Lys
 290 295 300
 20 Ile Asn Arg Lys Leu Gly Leu Gly Gly Asp His Asp Gly Leu Met Thr
 305 310 315 320
 Leu Thr Glu Glu Asp Ile Ala Thr Thr Ile Glu Tyr Leu Val Arg Leu
 325 330 335
 25 His Ala Gly Glu Arg Val Met Thr Ser Pro Asn Gly Glu Glu Ile Pro
 340 345 350
 Val Glu Thr Asp Asp Ile Asp His Phe Gly Asn Arg Arg Leu Arg Thr
 355 360 365
 30 Val Gly Glu Leu Ile Gln Asn Gln Val Arg Val Gly Leu Ser Arg Met
 370 375 380
 35 Glu Arg Val Val Arg Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ala Glu Ser Ile
 385 390 395 400
 Thr Pro Thr Ser Leu Ile Asn Val Arg Pro Val Ser Ala Ala Ile Arg
 405 410 415
 40 Glu Phe Phe Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Val Gln Asn Asn
 420 425 430
 Ser Leu Ser Gly Leu Thr His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu Gly Pro
 435 440 445
 45 Gly Gly Leu Ser Arg Glu Arg Ala Gly Ile Glu Val Arg Asp Val His
 450 455 460
 50 Pro Ser His Tyr Gly Arg Met Cys Pro Ile Glu Thr Pro Glu Gly Pro
 465 470 475 480
 Asn Ile Gly Leu Ile Gly Ser Leu Ala Ser Tyr Ala Arg Val Asn Pro
 485 490 495
 55 Phe Gly Phe Ile Glu Thr Pro Tyr Arg Arg Ile Ile Asp Gly Lys Leu
 500 505 510
 Thr Asp Gln Ile Asp Tyr Leu Thr Ala Asp Glu Glu Asp Arg Phe Val
 515 520 525
 60 Val Ala Gln Ala Asn Thr His Tyr Asp Glu Glu Gly Asn Ile Thr Asp
 530 535 540

	Glu Thr Val Thr Val Arg Leu Lys Asp Gly Asp Ile Ala Met Val Gly	545	550	555	560
5	Arg Asn Ala Val Asp Tyr Met Asp Val Ser Pro Arg Gln Met Val Ser	565	570	575	
	Val Gly Thr Ala Met Ile Pro Phe Leu Glu His Asp Asp Ala Asn Arg	580	585	590	
10	Ala Leu Met Gly Ala Asn Met Gln Lys Gln Ala Val Pro Leu Ile Arg	595	600	605	
	Ala Glu Ala Pro Phe Val Gly Thr Gly Met Glu Gln Arg Ala Ala Tyr	610	615	620	
15	Asp Ala Gly Asp Leu Val Ile Thr Pro Val Ala Gly Val Val Glu Asn	625	630	635	640
	Val Ser Ala Asp Phe Ile Thr Ile Met Ala Asp Asp Gly Lys Arg Glu	645	650	655	
	Thr Tyr Leu Leu Arg Lys Phe Gln Arg Thr Asn Gln Gly Thr Ser Tyr	660	665	670	
25	Asn Gln Lys Pro Leu Val Asn Leu Gly Glu Arg Val Glu Ala Gly Gln	675	680	685	
	Val Ile Ala Asp Gly Pro Gly Thr Phe Asn Gly Glu Met Ser Leu Gly	690	695	700	
	Arg Asn Leu Leu Val Ala Phe Met Pro Trp Glu Gly His Asn Tyr Glu	705	710	715	720
35	Asp Ala Ile Ile Leu Asn Gln Asn Ile Val Glu Gln Asp Ile Leu Thr	725	730	735	
	Ser Ile His Ile Glu Glu His Glu Ile Asp Ala Arg Asp Thr Lys Leu	740	745	750	
40	Gly Ala Glu Glu Ile Thr Arg Asp Ile Pro Asn Val Ser Glu Glu Val	755	760	765	
	Leu Lys Asp Leu Asp Asp Arg Gly Ile Val Arg Ile Gly Ala Asp Val	770	775	780	
45	Arg Asp Gly Asp Ile Leu Val Gly Lys Val Thr Pro Lys Gly Glu Thr	785	790	795	800
	Glu Leu Thr Pro Glu Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile Phe Gly Glu Lys	805	810	815	
	Ala Arg Glu Val Arg Asp Thr Ser Met Lys Val Pro His Gly Glu Thr	820	825	830	
55	Gly Lys Val Ile Gly Val Arg His Phe Ser Arg Glu Asp Asp Asp Asp	835	840	845	
	Leu Ala Pro Gly Val Asn Glu Met Ile Arg Ile Tyr Val Ala Gln Lys	850	855	860	
60					

Arg Lys Ile Gln Asp Gly Asp Lys Leu Ala Gly Arg His Gly Asn Lys
 865 870 875 880
 5 Gly Val Val Gly Lys Ile Leu Pro Gln Glu Asp Met Pro Phe Leu Pro
 885 890 895
 Asp Gly Thr Pro Val Asp Ile Ile Leu Asn Thr His Gly Val Pro Arg
 900 905 910
 10 Arg Met Asn Ile Gly Gln Val Leu Glu Thr His Leu Gly Trp Leu Ala
 915 920 925
 Ser Ala Gly Trp Ser Val Asp Pro Glu Asp Pro Glu Asn Ala Glu Leu
 930 935 940
 15 Val Lys Thr Leu Pro Ala Asp Leu Leu Glu Val Pro Ala Gly Ser Leu
 945 950 955 960
 Thr Ala Thr Pro Val Phe Asp Gly Ala Ser Asn Glu Glu Leu Ala Gly
 965 970 975
 20 Leu Leu Ala Asn Ser Arg Pro Asn Arg Asp Gly Asp Val Met Val Asn
 980 985 990
 25 Ala Asp Gly Lys Ala Thr Leu Ile Asp Gly Arg Ser Gly Glu Pro Tyr
 995 1000 1005
 Pro Tyr Pro Val Ser Ile Gly Tyr Met Tyr Met Leu Lys Leu His
 1010 1015 1020
 30 His Leu Val Asp Glu Lys Ile His Ala Arg Ser Thr Gly Pro Tyr
 1025 1030 1035
 Ser Met Ile Thr Gln Gln Pro Leu Gly Gly Lys Ala Gln Phe Gly
 1040 1045 1050
 35 Gly Gln Arg Phe Gly Glu Met Glu Val Trp Ala Met Gln Ala Tyr
 1055 1060 1065
 40 Gly Ala Ala Tyr Thr Leu Gln Glu Leu Leu Thr Ile Lys Ser Asp
 1070 1075 1080
 Asp Val Val Gly Arg Val Lys Val Tyr Glu Ala Ile Val Lys Gly
 1085 1090 1095
 45 Glu Asn Ile Pro Asp Pro Gly Ile Pro Glu Ser Phe Lys Val Leu
 1100 1105 1110
 Leu Lys Glu Leu Gln Ser Leu Cys Leu Asn Val Glu Val Leu Ser
 1115 1120 1125
 Ala Asp Gly Thr Pro Met Glu Leu Ala Gly Asp Asp Asp Asp Phe
 1130 1135 1140
 55 Asp Gln Ala Gly Ala Ser Leu Gly Ile Asn Leu Ser Arg Asp Glu
 1145 1150 1155
 Arg Ser Asp Ala Asp Thr Ala
 1160 1165
 60 <210> 7
 <211> 151

<212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <223> upstream-Bereich

 <400> 7
 10 gggtgccggt aatcctgttg cggacaatat ttacaggatc tgacacattg ggcacgctg 60
 ggggagtggt ctctagggcc gccggcgcat aggaggcgcc gggaaattgc tgaccaagca 120
 gagtgtaggg attgtcggtc acatcagaga t 151

 15 <210> 8
 <211> 1926
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

 20 <400> 8
 gggtgccggt aatcctgttg cggacaatat ttacaggatc tgacacattg ggcacgctg 60
 ggggagtggt ctctagggcc gccggcgcat aggaggcgcc gggaaattgc tgaccaagca 120
 25 gagtgtaggg attgtcggtc acatcagaga tcagctctac aagagtgtct aagtggcggg 180
 cattccatgc tttggaggag cgatcttcaa attcctcaa agtgagttga cctcgggaaa 240
 cagctgcaga aagttcatcc acgacttggg ttccggttaag gtcagtggcg agcttctttg 300
 30 ctgggttcgtt tcttgagga acagtcattg gaaccattct aacaagggat ttgggtgtttt 360
 ctgcggctag ctgataatgt gaacggctga gtccactct ttagttggg aattgacggc 420
 35 acctcgact caagcgcggt atcgccctg gtttccggg acgcggtggc gcatgtttgc 480
 atttgatgag gttgtcgtg acatgtttg tcgggcccc aagagagccc cttttttgc 540
 gtgtctggac actttttcaa atccttcgcc atcgacaagc tcagccttcg tgttcgtccc 600
 40 ccgggctgca cgtcagcagt taaagaacaa ctccgaaata aggatgggtc atgccaacta 660
 ttcagcagct ggtcgtgaag ggccgccacg ataagtccg caaggtggct accgcggcac 720
 45 tgaagggttc cctcagcgt cgtggcgat gcacccgtgt gtacaccacc acccctaaga 780
 agcctaactc tgctcttcgt aaggtcgtc gtgtgcgcct tacctcggc atcgaggttt 840
 ccgcttacat ccttggtgag ggccacaacc tgcaggagca ctccatggtg ctcttcgctg 900
 50 gtgtcgtgt taaggacctc ccaggtgtc gttacaagat cgtcgtggc gcactggata 960
 cccagggtgt taaggaccgc aagcaggctc gttccccgt acggcgcgaa gaggggataa 1020
 55 ttaaaaatgc gtaaatcagc agctcctaag cgtccagtag ttcaggacct tgtatacaag 1080
 tccgagctcg ttaccagct cgtaacaag atcctcatcg gtggcaagaa gtccaccgca 1140
 gagcgcatcg tctacggtgc actcgagatc tgccgtgaga agaccggcac cgatccagta 1200
 60 ggaaccctcg agaaggctct cggcaacgtg cgtccagacc tcgaagttcg tccccgctg 1260

gttggtggcg ctacctacca ggtgccagtg gatgttcgcc cagagcgcg aaacaccctc 1320
 gcactgcggtt gggttgtaac cttcacccgt cagcgctcgtg agaaccacat gatcgagcgt 1380
 5 cttgcaaacy aacttctgga tgcagccaac ggccttggcg cttccgtgaa gcgtcgcgaa 1440
 gacaccacaca agatggcaga ggccaaccgc gccttcgctc actaccgctg gtagtactgc 1500
 caagacatga aagcccaatc acctttaaga tcaacgcctg ccggcgccct tcacatttga 1560
 10 ataagctggc agcctgcgtt tcttcaaggc gactgggctt ttagttctcat taatgcagtt 1620
 caccgctgta agatagctaa atagaaacac tgtttcggca gtgtgttact aaaaaatcca 1680
 15 tgtcacttgc ctcgagcgtg ctgcttgaat cgcaagttag tggcaaatg taacaagaga 1740
 attatccgta ggtgacaaac tttttaatac ttgggtatct gtcattggata ccccggtaat 1800
 aaataagtga attaccgtaa ccaacaagtt ggggtaccac tgtggcaca gaagtgttta 1860
 20 aggatctaaa caaggtccgc aacatcggca tcatggcgca catcgatgct ggtaagacca 1920
 cgacca 1926
 25
 <210> 9
 <211> 1594
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1594)
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Produkt enthaltend das
 35 rpsL-1545-Allel
 <220>
 <221> allele
 <222> (659)..(1039)
 40 <223> rpsL-1545-Allel
 <220>
 <221> mutation
 <222> (786)..(786)
 45 <223> Austausch von Adenin gegen Guanin
 <400> 9
 gatctagagg ttgccggtaa tcctgttgcg gacaatattt acaggatctg acacattggg 60
 50 catcgctggg ggagtgggtc cgtaggccgc cggcgcatag gaggcgccgg gaaattgctg 120
 accaagcaga gtgtagggat tgctgttcac atcagagatc agctctacaa gagtgtctaa 180
 gtggcgggca ttccatgctt tggaggagcg atcttcaa atctccaaag tgagttgacc 240
 55 tcgggaaaca gctgcagaaa gttcatccac gacttgggtt cggttaaggt cagtggcgag 300
 cttcttttgc ggttcgtttc cttgaggaac agtcattgga accattctaa caagggattt 360
 60 ggtgttttct gcggctagct gataatgtga acggctgagt cccactcttg tagttgggaa 420
 ttgacggcac ctcgcactca agcgcggtat cgccctggt tttccgggac gcggtggcgc 480

atgtttgcat ttgatgaggt tgtccgtgac atgtttggtc gggcccaaaa aagagccccc 540
 ttttttgcgt gtctggacac tttttcaaat ctttcgccat cgacaagctc agccttcgtg 600
 5 ttcgtccccc gggcgtcacg tcagcagtta aagaacaact ccgaaataag gatggttcat 660
 gccaaactatt cagcagctgg tccgtaaggg ccgccacgat aagtcgcga aggtggctac 720
 10 cgcggcactg aaggggttccc ctccagctcg tggcgatgac acccggtgtg acaccaccac 780
 ccctaggaag cctaactctg ctcttcgtaa ggtcgctcgt gtgcgcctta cctccggcat 840
 cgagggttcc gcttacatcc ctggtgaggg ccacaacctg caggagcact ccatggtgct 900
 15 cgttcgcggt ggtcgtgtta aggacctccc aggtgtccgt tacaagatcg tccgtggcgc 960
 actggatacc caggggtgtta aggaccgcaa gcaggctcgt tccccgctac ggcgcgaaga 1020
 20 ggggataatt aaaaatgcgt aaatcagcag ctctaagcg tccagtagtt caggacctg 1080
 tatacaagtc cgagctcgtt acccagctcg taaacaagat cctcatcggt ggcaagaagt 1140
 ccaccgcaga gcgcacgtc tacgggtgcac tcgagatctg ccgtgagaag accggcaccg 1200
 25 atccagtagg aaccctcgag aaggctctcg gcaacgtcgc tccagacctc gaagtctggt 1260
 cccgccgtgt tgggtggcgt acctaccagg tgccagtga tgttcgcca gagcgcgcaa 1320
 30 acaccctcgc actgcgttgg ttggtaacct tcaccctca gcgtcgtgag aacaccatga 1380
 tcgagcgtct tgcaaacgaa cttctggatg cagccaacgg ccttggcgct tccgtgaagc 1440
 gtcgcgaaga caccacaag atggcagagg ccaaccgcgc cttcgctcac taccgtggt 1500
 35 agtactgcca agacatgaaa gcccaatcac cttaagatc aacgcctgcc ggcgccttc 1560
 acatttgaat aagctggcag cctgcgtcta gatc 1594
 40 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 45 <220>
 <221> Primer
 <222> (1)..(20)
 <223> rpsL-1
 50 <400> 10
 cagctctaca agagtgtcta 20
 <210> 11
 <211> 20
 55 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <220>
 <221> Primer
 60 <222> (1)..(20)
 <223> rpsL-2

<400> 11
tggtcgtggt cttaccagca 20

5 <210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223> rpsL_XL-A1

15 <400> 12
gatctagagg ttgccggtaa tcctgttg 28

20 <210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223> rpsL_XL-E1

<400> 13
gatctagacg caggctgcca gcttattc 28

30 <210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

35 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(20)
<223> rL-1

40 <400> 14
atgaggttgt ccgtgacatg 20